



Patent
Attorney Docket No. 026350-071

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Yoji Sakagami et al.

Application No.: 10/078,678

Filing Date: February 21, 2002

Title: PRECURSOR POLYPEPTIDE OF PHYTOSULFOKINE DERIVED FROM ARABIDOPSIS THALIANA
AND A GENE ENCODING SAID POLYPEPTIDE

Group Art Unit: 1638

Examiner: RUSSELL KALLIS

Confirmation No.: 4782

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: Japan

Patent Application No(s).: 2001-052946

Filed: February 27, 2001

In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration and/or the Application Data Sheet. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

Date: June 23, 2004

By

Erin M. Dunston

Registration No. 51,147

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日
Date of Application: 2001年 2月27日

出願番号
Application Number: 特願2001-052946

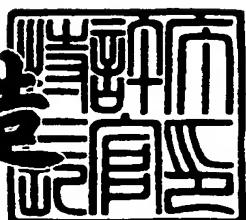
[ST.10/C]: [JP2001-052946]

出願人
Applicant(s): 名古屋大学長

2002年 2月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3009377

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : February 27, 2001

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2001-052946

[ST. 10/C] : [JP2001-052946]

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on February 22, 2002

Certification No. 2002-3009377

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : February 27, 2001

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2001-052946

[ST. 10/C] : [JP2001-052946]

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on February 22, 2002

Certification No. 2002-3009377

【書類名】 特許願
 【整理番号】 U2000P202
 【提出日】 平成13年 2月27日
 【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿
 【国際特許分類】 C12N 15/29
 A01H 4/00
 【発明の名称】 シロイヌナズナのファイトスルフォカイン前駆体ポリペ
 プチド、当該ポリペプチドをコードする遺伝子
 【請求項の数】 12
 【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区北千種1-9-11, 8-36
 【氏名】 坂神 洋次
 【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市守山区大谷町4-8, A102
 【氏名】 松林 嘉克
 【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区千代が丘1, 千代が丘団地104
 -205
 【氏名】 楊 和平
 【特許出願人】
 【識別番号】 391012224
 【氏名又は名称】 名古屋大学長 松尾 稔
 【代理人】
 【識別番号】 100072051
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 杉村 興作
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100059258
 【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 晓秀

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709851

【書類名】 明細書

【発明の名称】 シロイヌナズナのファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドであり、以下の(a)または(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-87で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) ファイトスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現する事が可能な、(a)の一部が欠損、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項3】 請求項1記載のポリペプチドをコードし、配列表の配列番号2に示す、塩基番号40-303で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項4】 シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドをコードし、以下の(c)または(d)に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(c) 配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-545で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(d) (c)の一部が欠損、置換若しくは付加された、遺伝子。

【請求項5】 請求項2から請求項4のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を植物細胞に導入する事により、植物細胞の増殖を促進させる方法。

【請求項6】 請求項2から請求項4のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を植物細胞に導入する事により、植物の成長を促進させた形質転換植物。

【請求項7】 シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプ

チドであり、以下の（e）または（f）に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

（e）配列表の配列番号3に示す、アミノ酸番号1-79で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

（f）ファイタルスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイタルスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイタルスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現する事が可能な、（e）の一部が欠損、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【請求項8】 請求項7記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項9】 請求項7記載のポリペプチドをコードし、配列表の配列番号4に示す、塩基番号43-282で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項10】 シロイヌナズナ由来のファイタルスルフォカインの前駆体ポリペプチドをコードし、以下の（g）または（h）に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

（g）配列表の配列番号4に示す、塩基番号1-479で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

（h）（g）の一部が欠損、置換若しくは付加された、遺伝子。

【請求項11】 請求項8から請求項10のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を植物細胞に導入する事により、植物細胞の増殖を促進させる方法。

【請求項12】 請求項8から請求項10のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を植物細胞に導入する事により、植物の成長を促進させた形質転換植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物細胞の増殖を促進する作用を有するペプチドの前駆体である、シロイヌナズナ由来のファイタルスルフォカイン前駆体ポリペプチド、当該前駆体ポリペプチドをコードする遺伝子、更には当該遺伝子を導入する事による植物細

胞の増殖促進方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、植物遺伝子工学の発達により、種々の外来遺伝子を導入した植物の作製が盛んに行われている。そのような技術は多くの植物に対して利用されていて、産業的にも重要な役割を果たしており、例えば植物細胞が生産する2次代謝産物の生産性を高めたような、有用な新種の植物を得る事が可能である。

【0003】

外来遺伝子を導入した形質細胞植物を作製するにあたり、遺伝子導入した少数の遊離細胞を培養して植物体を再生する必要があるが、外来遺伝子を導入した植物の細胞は成長が遅く、植物個体まで分化させる事が困難である場合が多くあった。それは、植物細胞は細胞外に未知の増殖因子を分泌するが、細胞密度が低い場合には、増殖因子が必要濃度に達するのに時間がかかったり、培地中で分解する速度の方が速くなってしまうためである。また、培養そのものが困難であったり、増殖が非常に遅い植物種が多数ある。よって、植物細胞を培養するにあたり、その増殖を促進する事を可能とする手段が求められていた。

【0004】

その様な目的を達成するために、本発明者らは、ペプチド性の植物の増殖因子であるファイトスルフォカイン（phytosulfokine : PSK）に注目し、検討を行ってきた。PSKは一度培養に使用したいわゆる「馴化培地」（Conditioned Medium : CM）中に含有される植物細胞の増殖因子の一つであり、いわゆるオートクライン的に作用することが知られている。一般的に植物細胞を培養するには、既知のホルモンや種々の栄養素を培養液に添加することが行われているが、培養そのものが困難である植物種や増殖が非常に遅い植物種が存在する。また細胞密度が非常に低い場合にも、培養が困難となるが、それらの場合に細胞増殖を活性化する目的に、ファイトスルフォカイン（PSK）が有効である。また、PSKは翻訳後修飾によりそのチロシン残基が硫酸化されたペプチドであり、 α 型と β 型の2つの型が存在している。PSK- α 及びPSK- β の本体は、翻訳後修飾によりそのチロシン残基が硫酸化された、以

下の構造から成るペプチドであることが知られている。 β 型は α 型の酵素的分解産物であり、 β 型の細胞増殖活性は α 型と比較して約10分の1である。

P S K - α : Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln

P S K - β : Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr

【0005】

なお、上記のP S K - α 及びP S K - β は、前駆体の形で生合成されて、トランスゴルジネットワークを経由する間に、硫酸化及びプロセシングを受けて、P S Kが切り出されることが知られている。その様な前駆体の一つである、イネのP S K前駆体ポリペプチド(Oryza sativa phytosulfokine: Os P S K)をコードする遺伝子のcDNA塩基配列は、cDNAクローニングの手法により既に本発明者らにより解析されている。また、そのようにして得たcDNA及び当該cDNAがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を特許出願し、それらにつき特許登録されている(特許第3038381号)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

上記の様に、イネにおいてファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチド及びそれをコードする遺伝子は知られていた。イネは单子葉植物であり、産業上において重要な穀物であるので、イネにおいてファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチド及びそれをコードする遺伝子が得られた意義は大きかった。しかし、これまで双子葉植物においては、ファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチド及びそれをコードする遺伝子は採取されておらず、それらの配列は知られていなかった。これまでに、イネ、アスパラガス等の单子葉植物のみならず、シロイヌナズナ、ヒヤクニチソウ、ニンジン等の双子葉植物由来の細胞からもP S Kが検出されていることを考えると、ファイトスルフォカインの前駆体である遺伝子は、植物界に普遍的に存在し、植物の細胞増殖と成長に重要な役割を果たしていると考えられる。

【0007】

また、单子葉植物と双子葉植物が存在する植物の多様性及び産業上の需要を考えると、双子葉植物においても、ファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチド及

びそれをコードする遺伝子を得ることの意義は大きいと考えられる。尚、シロイヌナズナは植物体が小さく、1世代の時間が短く、またゲノムサイズが小さい事から、植物遺伝学の分野で代表的なモデル植物として使用されている。そこで、双子葉植物の中でシロイヌナズナを選び、本発明者らは解析を行った。シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチド及びそれをコードする遺伝子を採取し、それらの配列を決定することが、本発明の課題である。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明の第一の観点は、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドである、AtPSK2ポリペプチドである。本ポリペプチドは、以下の(a)または(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチドである。

(a) 配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-87で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) ファイトスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現する事が可能な、(a)の一部が欠損、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【0009】

本発明の第二の観点は、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドである、AtPSK2ポリペプチドをコードする遺伝子としての、下記(1)から(3)の遺伝子である。

(1) 上記のAtPSK2ポリペプチドをコードする、遺伝子。

(2) 上記のAtPSK2ポリペプチドをコードし、配列表の配列番号2に示す、塩基番号40-303で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(3) シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドをコードし、以下の(c)または(d)に示す塩基配列からなることを特徴とする、

遺伝子。

(c) 配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-545で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(d) (c) の一部が欠損、置換若しくは付加された、遺伝子。

【0010】

本発明の第三の観点は、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドである、AtPSKLポリペプチドである。本ポリペプチドは、以下の(e)または(f)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチドである。

(e) 配列表の配列番号3に示す、アミノ酸番号1-79で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(f) ファイトスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現する事が可能な、(e)の一部が欠損、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【0011】

本発明の第四の観点は、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドである、AtPSKLポリペプチドをコードする遺伝子としての、下記(4)から(6)の遺伝子である。

(4) 上記のAtPSKLポリペプチドをコードする、遺伝子。

(5) 上記のAtPSKLポリペプチドをコードし、配列表の配列番号4に示す、塩基番号43-282で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(6) シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチドをコードし、以下の(g)または(h)に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(g) 配列表の配列番号4に示す、塩基番号1-479で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(h) (g) の一部が欠損、置換若しくは付加された、遺伝子。

【0012】

上記のシロイヌナズナ由来のファイトスルフォカインの前駆体ポリペプチド及びそれをコードする遺伝子が採取された経緯は以下の通りである。本発明者らは、シロイヌナズナの根からカルスを誘導し、カルスからcDNAライブラリーを作製した。cDNAを鋳型として、適切に設計したプローブを用いてPCRを行ったところ、増幅されるバンドが得られ、そのシークエンスを解析したところ、2種類のクローンにPSKをコードする配列が見られた。これらをプローブに用いて、cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、AtPSK2とAtPSKLという、2つのクローンが得られた。

【0013】

これらの配列を決定したところ、AtPSK2は全長545塩基から成る遺伝子であり、87アミノ酸から成るPSK前駆体ポリペプチドをコードしていた。また、AtPSKLは全長479塩基から成る遺伝子であり、79アミノ酸から成るPSK前駆体ポリペプチドをコードしていた。AtPSK2遺伝子またはAtPSKL遺伝子により、シロイヌナズナ培養細胞を形質転換したところ、両遺伝子ともPSKを分泌する事が確認された。また、AtPSK2遺伝子またはAtPSKL遺伝子により形質転換されたシロイヌナズナ培養細胞は、細胞増殖が促進していることが確認された。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、ファイトスルフォカイン前駆体をコードするシロイヌナズナ由来の遺伝子である、AtPSK2遺伝子である。尚、ファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドとは、ファイトスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現することができる、ポリペプチドを意味する。本発明の遺伝子は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-545で示される塩基配列からなることを特徴とする。配列表の配列番号2に示す塩基配列のうち塩基番号4

0-303で示される部分が読み枠であり、下記のA t P S K 2ポリペプチドをコードしている。

【0015】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとすることが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

【0016】

即ち、配列表の配列番号2に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号2に示す塩基配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換された遺伝子である。また、その様な遺伝子と配列番号2に示す塩基配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相同性を有する。その様な遺伝子も、ファイタルスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現することができる、ファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドとしての性質を有するポリペプチドをコードする限り、本発明の範囲内である。

【0017】

更に本発明は、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドである、A t P S K 2ポリペプチドである。A t P S K 2ポリペプチドは、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-87で示されるアミノ酸配列により特定される。このアミノ酸配列は、配列表の配列番号2に記載されている塩基配列の、オープンリーディングフレーム（読み枠）部分によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0018】

配列番号1に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号1に示すアミノ酸配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下のアミノ酸が置換されたポリペプチドである。また、その様なポリペプチドと配列番号1に示すアミノ酸配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相同性を有する。その様なポリペプチドも、ファイトスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現することができる、ファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドとしての性質を有する限り、本発明の範囲内である。

【0019】

更に本発明は、やはりファイトスルフォカイン前駆体をコードするシロイヌナズナ由来の遺伝子である、AtPSKL遺伝子である。本発明の遺伝子は、配列表の配列番号4に示す、塩基番号1-479で示される塩基配列からなることを特徴とする。配列表の配列番号4に示す塩基配列のうち塩基番号43-282で示される部分が読み替であり、下記のAtPSKLポリペプチドをコードしている。

【0020】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとすることが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

【0021】

即ち、配列表の配列番号4に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号4に示す塩基配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換された遺伝子である。また、そ

の様な遺伝子と配列番号4に示す塩基配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相同性を有する。その様な遺伝子も、ファイタルスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現することができる、ファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドとしての性質を有するポリペプチドをコードする限り、本発明の範囲内である。

【0022】

更に本発明は、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドである、AtPSKLポリペプチドである。AtPSKLポリペプチドは、配列表の配列番号3に示す、アミノ酸番号1-79で示されるアミノ酸配列により特定される。このアミノ酸配列は、配列表の配列番号4に記載されている塩基配列の、オープンリーディングフレーム（読み梓）部分によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0023】

配列番号3に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号3に示すアミノ酸配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下のアミノ酸が置換されたポリペプチドである。また、その様なポリペプチドと配列番号3に示すアミノ酸配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相同性を有する。その様なポリペプチドも、ファイトスルフォカインをその配列内に含有しており、植物細胞内でプロセシング及びファイトスルフォカインのチロシン残基の硫酸化を受け、チロシン硫酸化されたファイトスルフォカインを細胞外へ分泌して植物細胞の増殖促進活性を発現することができる、ファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドとしての性質を有する限り、本発明の範囲内である。

【0024】

本発明のAtPSK2遺伝子又はAtPSKL遺伝子を植物に導入して形質転換を行う方法、AtPSK2遺伝子又はAtPSKL遺伝子を導入して得た形質転換した植物細胞もまた、本発明の範囲内である。本発明のAtPSK2遺伝子

及びAtPSKL遺伝子は、上述した様にファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドをコードする遺伝子である。よって、下記に実施例で示す様に、AtPSK2遺伝子又はAtPSKL遺伝子を導入して植物細胞を形質転換することにより、培地中にファイトスルフォカインが分泌されることが確認された。またAtPSK2遺伝子又はAtPSKL遺伝子により形質転換した植物細胞は、細胞増殖が促進されていることもまた確認された。

【0025】

よって、AtPSK2遺伝子又はAtPSKL遺伝子遺伝子を導入することにより、植物細胞の増殖を促進する事ができる。本発明のAtPSK2遺伝子又はAtPSKL遺伝子を導入する植物の例としては、ユリ、イネ、トウモロコシ、アスパラガス、コムギ等の单子葉植物、またシロイヌナズナ、タバコ、ニンジン、ダイズ、トマト、ジャガイモ、ヒヤクニチソウ等の双子葉植物が挙げられる。原理的には、あらゆる植物に本発明の遺伝子を導入して、植物細胞の増殖を促進することが可能である。

【0026】

形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えば実施例で使用したpMAT037のみならず、例えばpIG122プラスミド、pBI101、pBI121、pBI221、pAct-nos/Hmz、pTA7001およびpTA7002等が挙げられるが、それらに限定されるものではなく、本技術分野で汎用されている他のプラスミドを使用することもまた可能である。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、カルス又は幼植物に感染させることにより、形質転換植物を作製する事が可能であり、更に、そのような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。本発明の植物遺伝子を植物に導入する形質転換法はアグロバクテリウム法に限定されるものではなく、パーティクルガン法、電気穿孔法等の方法を用いる事も可能である。

【0027】

またその様にして細胞増殖を促進させた形質転換植物細胞より得られた植物体

、及び形質転換植物細胞を作製する方法も、本発明の範囲内である。本発明を、シロイヌナズナ培養細胞を用いた実施例で詳細に説明するが、上記の記載及び下記の実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0028】

【実施例】

以下の方法により、実験を行った。

(植物材料)

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ecotype Columbia (コレクション番号: Col-0) の種を、Lehle Seeds (ラウンドロック, TX, USA) より購入した。種をバーミキュライト上に植えつけ、 $150 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光を発する蛍光灯 (FL40SB RN、東芝、日本) により、連続的に照射しながら温室内で 25°C で生育させた。発芽後 28 日の苗を、ノザン解析のための RNA の材料として用いた。

【0029】

(細胞懸濁液の確立)

シロイヌナズナの種 (コレクション番号: Col-0) の表面を、70%エタノール中で 5 分間滅菌し、滅菌蒸留水で 3 回洗浄し、5% NaCl に 10 分間移し、滅菌蒸留水で 5 回洗浄し、Murashige and Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog, 1962) を含むペトリ皿にのせて発芽させた。16 時間明状態 / 8 時間暗状態のサイクルで、25°C で植物を生育させた。同様の培養室の環境を、組織培養方法にも用いた。28 日目の苗から根を採取し、0.5 mg/l の 2, 4-D と 0.05 mg/l の KIN を添加した B5 培地 (Gamborg et al., 1968) 上で培養した。外植体より得られたカルスを、同じ培地上で 2 週間間隔で継代培養した。

【0030】

(ゲノムDNAプロット解析)

CATB 法 (Murry and Thompson, 1980) を用いて、ゲノム DNA をカルスより抽出した。制限エンドヌクレアーゼを用いて、 $10 \mu \text{g}$ の DNA を消化し、0.8% (W/V) のアガロースグル上で分離し、20 x

SSC中で、Biodyneナイロンフィルター（バル、ニューヨーク、N.Y., USA）に転写した。5×SSC, 0.5% SDS、5×Denhardt's solution、及び $500\mu g/ml$ サケ精子DNAの溶液中で、50℃と65℃でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションには、Random Primed DNAラベリングキット（宝、滋賀、日本）により調製した ^{32}P でラベルされたプローブを用いた。2×SSCを用いて25℃で15分の洗浄を3回、その後0.1% SDSを含む2×SSCを用いて50℃と65℃で15分の洗浄を3回、ハイブリダイゼーションの後に行った。

【0031】

(cDNAライブラリーのスクリーニング)

10日間培養したカルスから、オリゴ(dT)カラムによりポリ⁺(A)mRNAを精製し、λgt10システム（宝、東京、日本）によりcDNAライブラリーを構築した。PSK-α前駆体をコードするDNA断片を増幅するために、cDNAライブラリーに由来するDNA(100ng)を部分cDNAの増幅の錆型として用いた。増幅には、λgt10フォワードプライマー及び15merの変性プライマー[5'-T(C)TGG(A)GTG(A)TAG(A)ATG(A)TA-3']の混合物を使用した。その変性プライマーは、PSK-αのアミノ酸配列が推定されるオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有する。1サイクルが、95℃で1分の変性、35℃で1分のアニーリング、そして、72℃で1分の重合化を1サイクルとするPCRを30サイクル、ロボサイクラー（ストラタジーン、ラホヤ、CA, USA）で行った。PCR生成物を、pCR2.1ベクター（インビトローゲン、カルスバッド、CA, USA）へライゲーションし、特異的なcDNA産物を用いて、ブラークハイブリダイゼーションにより、cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、上記の様に行った。

【0032】

(DNA配列解析)

ポシティブファージの挿入物を、pBS SK⁻ プラスミド（ストラタジーン）にサブクローン化した。大腸菌株JM109を、宿主プラスミドとして使用した。製造者に推奨されるマニュアルに従い、Kilo Sequencing K

it (宝) を用いて、DNAの配列決定を行うために、欠損クローンを生成した。プラスミドDNAの鑄型を、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ, フォスター, CA, USA) により増幅し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて、製造者のプロトコールに従って配列決定を行った。

【0033】

(キメラ遺伝子の構築)

AtPSK2のcDNAの核酸配列に基づいた22merのプライマー(5'-TC TTCTGGGAATAGATGTAATC-3')、及びAtPSKLのcDNAの核酸配列に基づいた24merのプライマー(5'-CTGAGAATAAATGTAATCGGTGTG-3')を合成した。そしてそれらのプライマーを、PSK- α の代わりに通常ではない [Ser⁴] PSK- α を生成するように設計した、変異cDNAを得るために使用した。変異をLA PCR インビトロミュータゲネシスキット(宝)を用いて導入し、配列決定により確認した。pMAT037 (Matsuoka and Nakamura, 1991)を、シロイヌナズナの根の形質転換のバイナリーベクターとして使用した。オリジナルのcDNA又は変異したcDNAを、SacI及びHindIIIにより又はKpnIにより消化し、インフレームをベクターの同じ部位に挿入し、cDNAをセンス又はアンチセンス方向で有するキメラ遺伝子を構築した。キメラ遺伝子の発現は、CaMV35S転写産物のプロモーターにより促進された。

【0034】

(シロイヌナズナの根の形質転換)

三親性交配 (Van Haute et al., 1983) により、アグロバクテリウム ツメファシエンス (C58CIRif^R) を構築物により形質転換した。基本的に既知の方法 (Valvekens et al., 1988) により、Arabidopsis ecotype Columbiaの根を、アグロバクテリウム法により形質転換した。50mg/l Kan sulphate (ライフテクノロジーズ、グランドアイスランド、NY, USA) 及び7

50 mg / l の塩酸バンコマイシン（和光、大阪、日本）を添加したカルス誘導培地 (B5 + 0.5 mg / l 2, 4-D 及び 0.05 mg / l KIN) で、共培養した根外植体を 3 週間インキュベートすることにより、形質転換した微小カルスが生成した。個々の再生微小カルスを新たな培地に移し、全ての形質転換体が独立した T-DNA 挿入物によることを保証した。導入された遺伝子を検出するために、形質転換したカルスよりゲノム DNA を単離し、BamHI により消化し、上記の方法でラベルされた cDNA とハイブリダイズさせた。バイナリーベクターのみで形質転換したシロイヌナズナ細胞を、コントロールとして用いた。

【0035】

(CMからのPSKの精製)

14 日培養したカルスから、濾過により CM を調製し、使用するまで -20°C で保存した。トリスを最終濃度 20 mM になるまで添加し、80 ml の CM を緩衝し、6.0 N の HC1 により pH を 8.0 に調整し、DEAE Sephadex A-25 カラム (1.7 × 8 cm, ファルマシア、ピスカタウェイ、NJ, USA) にかけた。そのカラムは最初に、pH 8.0 の 20 mM トリス - 塩酸緩衝液で平衡化しておいた。カラムを、50 ml の平衡化緩衝液で洗浄し、0.400, 800 そして 1200 mM の KC1 を含む 50 ml の緩衝液により、60 ml / h で連続的に溶出した。PSK を含んでいる最後の 2 つの画分に、TFA を添加して、最終濃度を 0.1% とした。そしてそのサンプルを、0.1% TFA で平衡化した Sep-Pak Vac カラム (12 cc, C18, ミリポア、東京、日本) にかけた。同じバッファーを 30 ml 用いて、流速 60 ml / h でカラムを洗浄し、0.1% TFA を含む 30% アセトニトリル 30 ml で溶出した。PSK を含む画分を採取し、更に解析するために凍結乾燥した。

【0036】

(LC/MS 解析)

マススペクトルは、Jasco PU 980 HPLC システムに接続したエレクトロスプレイ イオン化装置を備えた、Fisons VG platform quadrupole mass spectrometer を用いて得

た。PSKを含む画分を200μlの水に溶解し、逆層HPLCカラム（D e v e l o s i l ODS-HG-5、4.6×250mm, 野村化学、瀬戸、日本）上で、0.1%TFAを含む10%アセトニトリルにより、流速1.0ml/分で分離を行った。分離している間、100μl/分を質量分析機に流した。PSKの偽分子イオンは、選択したイオンモニタリングにより、1.9秒毎に走査された。そのイオンモニタリングは、m/z 831（[Ser⁴] PSK-αの[M-H]⁻）、m/z 751（[Ser⁴] PSK-αの[M-H-SO₃]⁻）、m/z 845（PSK-αの[M-H]⁻）、m/z 765（PSK-αの[M-H-SO₃]⁻）、m/z 703（[Ser⁴] PSK-βの[M-H]⁻）及びm/z 717（PSK-βの[M-H]⁻）である。CM中における、PSK-α、PSK-β、[Ser⁴] PSK-α、[Ser⁴] PSK-βの半定量的な量は、内部標準を用いないでピーク高さより測定した。[Ser⁴] PSK-α又は[Ser⁴] PSK-βを含む画分を別々に採取し、凍結乾燥し、20μlの水に溶解して配列決定を行った。

【0037】

(アミノ酸配列解析)

アミノ酸配列は、490 Precise Protein Sequencing System（アプライドバイオシステムズ）を用いて、エドマン分解により決定した。各サイクルで得られた、アミノ酸のフェニルチオヒダントイン誘導体を、Brownlee C-18カラムで、逆層HPLCにより解析した。

【0038】

(AtPSK2遺伝子及びAtPSKL遺伝子の発現解析)

シロイヌナズナの根、葉、苗条から、又は報告された方法（Chomczynski, 1993）により1, 3, 7, 10又は14日インキュベートした培養細胞から、全RNAを単離した。20μgをとり、50%ホルムアミド、1×MOPS (200mM MOPS, 10mM EDTA, 50mM NaOAc pH 7.0) 及び1.5%ホルムアルデヒドの溶液中で、65℃で5分間変性させた。その後RNAを、2.2Mホルムアルデヒドを含む1.2% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動により分画し、20×SSC中でビオダインナイロン膜

(バル)に転写し、上述した様に³²PラベルしたcDNAをハイブリダイズさせた。

【0039】

以下、上記の方法により行った実験の結果を述べる。

(シロイヌナズナ遺伝子の、PSK前駆体としての特性解析)

10日間培養したシロイヌナズナ細胞から、ポリ(A)⁺RNAを精製し、λgt10ベクターによりcDNAライブラリーを構築するのに用いた。イネPSK前駆体(OsPSK)のcDNAをプローブとして、シロイヌナズナのPSK前駆体cDNAを得ようとする試みは、不成功であった。cDNAライブラリーをスクリーニングするプローブを得るために、cDNAライブラリーから単離されたDNAの100ngを用いて、PCRを行った。ここにおいて、PSK-αのアミノ酸配列が推定される配列に相補的な変性プライマー、及びλgt10プライマーを使用したところ、300bpの主要バンドが検出された。PCR産物をpBluscript(pBS)SK⁻ベクターにクローン化し、配列決定をした。少なくとも2つの断片、即ちAtPSK2とAtPSKLが、前駆体をコードしていると予測された。そして、それらをAtPSK2とAtPSKLに対応する全長cDNAを単離するプローブとして用いた。

【0040】

スクリーニングをした 3×10^5 個のファージの中で、AtPSK2については5クローンが、AtPSKLについては7クローンが得られた。最長のクローンの核酸配列を、両鎖とも完全に決定した。AtPSK2のcDNAは長さが524bpであり、21個のアデノシン残基のポリアデニルテイルを有していた。AtPSK2の塩基配列と推定アミノ酸配列を、図1に示す。ポリアデニルテイルの19bp及び62bp上流に、ポリアデニレーションモチーフ(AATAAA)が見出された。2つの35bpの繰り返し(5'-AGAAGTTGACAATAAAAGTTATAGTGTCGTTG-3'及び5'-AGAAGTTGACAATAAAACTTATAGTGTGTTG-3')が、3'非翻訳領域に見られた(図1)。AtPSK2のcDNAは261bpの読み枠を有し、その読み枠は87アミノ酸(図1)から成り9.6kDaの推定分子量を有する、PSK前駆体をコードしていた。

【0041】

また、AtPSKLの塩基配列と推定アミノ酸配列を、図2に示す。AtPSKLのcDNAは、上記の繰り返し配列を有さないために、AtPSK2のcDNAより短かった。従って、AtPSKLのcDNAより推定された前駆体は、AtPSK2の前駆体より短かった。AtPSKLは79アミノ酸をコードしており、推定分子量8.9kDaである(図2)。

【0042】

(AtPSK2及びAtPSKLによりコードされるPSK前駆体の構造)

予期された様に、AtPSK2によりコードされる前駆体ポリペプチドである、AtPSK2前駆体ポリペプチド(プレプロファイトスルフォカイン2:PP-PSK2)は、潜在的な疎水性N末端シグナル配列(1-22残基)を有しており、プロファイトスルフォカイン(PP-PSK)のアミノ酸の長さは65アミノ酸であると予測された。図1に示される様に、プレプロファイトスルフォカイン2(PP-PSK2)の中で5アミノ酸のPSK- α 配列は、C末端の近くに1回だけ見られた(アミノ酸78-82)。PSK- α の最初のチロシンに対して-1の位置に、アスパラギン酸残基が存在しており、それは、PSK- α 配列はチロシン残基において硫酸化されることを示している(Hanai et al., 2000)。興味深い事に、2つのアルギニン残基(アミノ酸69-70)と3つのリジン残基(アミノ酸83-85)が存在していた。

【0043】

AtPSKLによりコードされる前駆体ポリペプチドである、AtPSKL前駆体ポリペプチド(プレプロファイトスルフォカインL:PP-PSKL)もまた、潜在的なN末端シグナル配列(アミノ酸1-21)を含み、また1コピーのPSK- α 配列(アミノ酸71-75)をC末端に含んでいることが見出された(図2)。アスパラギン酸残基が、PSK- α の最初のチロシンに対して-1の位置に保存されていた。また、2つのアルギニン(アミノ酸62-63)と1つのリジン残基(アミノ酸78)が、PSK- α 配列の境界に見出された(図2)。

【0044】

(ファイトスルフォカイン前駆体遺伝子のコピー数)

シロイヌナズナゲノム中における、AtPSK2とAtPSKLのコピー数を、ゲノミックサザンプロット解析により検討した。AtPSK2における結果を図3に、AtPSKLにおける結果を図4に示す。なお、図3及び図4において、BamHI（レーン1）、RcoRI（レーン2）、HindIII（レーン3）及びXbaI（レーン4）で消化を行った結果を示す。全長cDNAにより、野生型DNAを探索し、低ストリンジエント及び高ストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションを行った。結果として、4つの異なった制限酵素の単独消化により得られたDNA断片の中で、一つのバンドのみが、低ストリンジエント又は高ストリンジエントな条件下で検出された。これはAtPSK2とAtPSKLは両方とも單一コピー遺伝子であることを示している。

【0045】

(シロイヌナズナ及びイネのファイトスルフォカイン前駆体の相同性)

GenomeNet CLUSTALW Serverにより提供された、CLUSTAL W (1.7) Multiple Sequence Alignmentにより、シロイヌナズナ及びイネのファイトスルフォカイン前駆体のアミノ酸配列を比較した。AtPSK2とイネプレプロファイトスルフォカイン(OsPSK)との相同性を検討した結果を図5に、AtPSKLとOsPSKとの相同性を検討した結果を図6に、AtPSK2とAtPSKLの相同性を検討した結果を図7に、それぞれ示す。図5、図6、図7において、一致しているアミノ酸を、アスタリスク (*) で示す。非常に意外な事に、これらの3つのPP-PSKは全体的に、明らかな相同性は示さなかった。しかし、PSK- α 配列及びN末端方向に隣接する3つのアミノ酸（計8アミノ酸）は、完全に保存されていた。この8アミノ酸の領域を、PSK領域と呼ぶ。更に、N末端シグナルペプチドには、非常に限られた相同性しか見出されなかった。

【0046】

(形質転換細胞における、PSK前駆体cDNAの発現)

AtPSK2とAtPSKLが、本当にPSK前駆体をコードしているか検討するために、28日目のシロイヌナズナの根の形質転換を行った。形質転換には

、PSK- α の代わりに [Se r⁴] PSK- α を產生させる様に設計した、人工的に変異させたAtPSK2又はAtPSKLのcDNAをセンス方向で使用した。また、野生型cDNAをセンス方向及びアンチセンス方向で使用した。バイナリーベクターpMAT037 (Matsuoka and Nakamura, 1991) 中に導入した、構成的なカリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35Sプロモーターの制御下に、キメラ遺伝子を置いた。バイナリーベクターのみで形質転換したシロイヌナズナ細胞を、コントロールとして用いた。0.5mg/Lの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)及びカイネチン(KIN)を添加したB5培地(Gamborg et al., 1968)用いて、カルスを誘導した。

【0047】

キメラ遺伝子を含むアグロバクテリウムで感染させて3週間後、黄色っぽいカナマイシン耐性カルスが、根外植体の上に形成された。1つの根外植体あたり、平均して1個から2個の再生カルスが通常は形成した。カナマイシン選抜に基づいたこの方法を用いて、再現性のある形質転換を行う事ができ、形質転換効率は57%から79%であった。無作為に選んだカナマイシン耐性のカルスからDNAを抽出し、DNAゲルプロットハイブリダイゼーションにより解析を行った。

【0048】

AtPSK2における結果を図8に、AtPSKLにおける結果を、図9に示す。図8において、コントロール植物より単離したDNA(レーン1)、変異遺伝子を導入した植物より単離したDNA(レーン2)、AtPSK2をセンス方向で導入した植物より単離したDNA(レーン3)、AtPSK2をアンチセンス方向で導入した植物より単離したDNA(レーン4)を、ラベル化したAtPSK2 cDNAでハイブリダイズさせた結果を、それぞれ示す。図9において、コントロール植物より単離したDNA(レーン1)、変異遺伝子を導入した植物より単離したDNA(レーン2)、AtPSKLをセンス方向で導入した植物より単離したDNA(レーン3)、AtPSKLをアンチセンス方向で導入した植物より単離したDNA(レーン4)を、ラベル化したAtPSKL cDNAでハイブリダイズさせた結果を、それぞれ示す。図8と図9において、内在性遺伝子

のバンドを実線の矢印で、導入した遺伝子のバンドを点線の矢印で示している。結果として、導入された遺伝子は形質転換したカルスの全てにおいて検出された。形質転換体うち70%程は、単一の遺伝子座に挿入されていた。

【0049】

変異したcDNAのインフレームを有するキメラ遺伝子を、最初にシロイヌナズナの根の細胞に導入した。形質転換細胞は、79%の確率で得られ、液体カルス誘導培地に移した。継代培養に着手して2週間後、PSK- α と、形質転換した細胞によるCM中の相同物を精製し、液体クロマトグラフィー/マススペクトル(LC/MS)解析にかけた。pMAT037ベクターのみを含む形質転換細胞ではPSK- β のみが検出されたが、変異したAtPSK2又はAtPSKLのcDNAのいずれかを有する形質転換細胞のCMより得られた溶出液中には、PSK- β 及び[Ser⁴]PSK- β のピークの両者が存在していた(表1)。更に、[Ser⁴]PSK- β に対応する画分に含まれるペプチドの配列決定により、それが本当にYIYSであることが確認された。これらの結果は、AtPSK2とAtPSKLの両者が、PSKの前駆体をコードしている事を示している。

【0050】

更に、野生型cDNAを、センスとアンチセンスの方向でシロイヌナズナの細胞に導入し、PSK前駆体遺伝子が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。形質転換細胞は、センスキメラ遺伝子については73%の確率で、アンチセンス構築物については57%の確率で得られた。導入された遺伝子を、サザンプロット解析により確認し(図8、図9)、図10と図11において形質転換細胞におけるmRNAの量を検討した。AtPSK2における結果を図10に、AtPSKLにおける結果を図11に、それぞれ示す。図10と図11において、カラム1はセンス形質転換細胞の結果を、カラム2はコントロール細胞の結果を、カラム3はアンチセンス形質転換細胞の結果を、それぞれ示す。尚、図10と図11のAはAtPSK2又はAtPSKLのmRNAをプロッティングにより検出した結果を、BはAを定量化した結果を、Cは構成的に発現しているアクチンを検出した結果を、それぞれ示す。PP-PSK(プレプロファイトスルフォカイン)のmR

NAの量は、センスにおいてはコントロールと比較して高かったが、アンチセンス形質転換細胞においてはコントロールと比較して低くなった。即ち、AtPSK2と、AtPSKLのいずれにおいても、センス導入細胞においてはmRNAの量は増加し、アンチセンス導入細胞においてはmRNAの量は減少していた。

【0051】

形質転換細胞における、細胞分裂の速度を検討した。AtPSK2における結果を図12に、AtPSKLにおける結果を図13に、それぞれ示す。図12と図13において、Aはコントロール細胞の結果を、Bはセンス形質転換細胞の結果を、Cはアンチセンス形質転換細胞の結果を、それぞれ示す。PSK前駆体遺伝子の過剰発現により、形質転換した細胞はコントロールと比較して、約2倍の速さで分裂した。対照的に、アンチセンスcDNAによってPSK前駆体遺伝子の発現が抑制された形質転換細胞は、劇的に分裂活性が低下した。培地中にPSK- α を添加することにより、これは部分的に変化した。これらのデータは、AtPSK2とAtPSKLの遺伝子の両者は、生成物であるPSK- α を介して、植物細胞分裂に関与していることを示している。

【0052】

センス、アンチセンス又は変異したcDNAを有する形質転換細胞について、CM中へのPSKアナログの分泌を定量した。形質転換細胞を新たな培地に移して2週間後、CM中のPSK量をLC/MSにより、内部標準のないピーク高さに基づいて測定した。バイナリーベクターのみを含むシロイヌナズナ細胞を、コントロールとして用いた。ノザンプロット解析に一致して、センス形質転換細胞のCM中に蓄積したPSKの濃度は、コントロールの約20倍であった(表1)。一方、アンチセンス形質転換細胞のCM中におけるPSK量は、コントロールの平均値の50%以下であった(表1)。変異したcDNAの形質転換細胞により生成した[Ser⁴]PSK- β は、内在性遺伝子より得られたPSK- β の、10倍以上に達した(表1)。

【0053】

【表1】

構築物	P S K - β	[S e r ⁴] P S K - β
p M A T 0 3 7	413.5±29.7	0
A t P S K 2 変異体	387.1±40.9	3750.5±39.5
センス	7406.2±57.4	0
アンチセンス	193.6±37.7	0
A t P S K L 変異体	349.8±35.5	4785.2±50.2
センス	8693.6±79.8	0
アンチセンス	164.9±42.3	0

【0054】

(A t P S K 2とA t P S K Lの発現)

懸濁培養細胞より抽出したRNAのRNAプロット解析は、A t P S K 2遺伝子は連続的に発現し、P S Kを生産していることを示唆しており、それにより細胞は迅速に増殖することができる。細胞培養の日数による、RNA量の経時変化を解析した。A t P S K 2における結果を図14に、A t P S K Lにおける結果を図15に、それぞれ示す。図14と図15において、レーン1は1日培養した細胞における結果を、レーン2は3日培養した細胞における結果を、レーン3は7日培養した細胞における結果を、レーン4は10日培養した細胞における結果を、レーン5は14日培養した細胞における結果を、それぞれ示す。尚、図14と図15のAはA t P S K 2又はA t P S K LのmRNAをプロッティングにより検出した結果を、BはAを定量化した結果を、Cは構成的に発現しているアクチンを検出した結果を、それぞれ示す。細胞を新しい培地に移した後に、A t P S K 2の転写産物はしだいに増加し、7日から10日後に最大の発現量が観察され、その後減少した(図14)。A t P S K LはA t P S K 2と類似の発現パターンを示したが、発現の開始は早く、転写産物の増加も早く、絶対量も多かった(図15)。

【0055】

発芽後28日目のシロイヌナズナ芽生えを、RNA抽出の起源として使用し、種々の組織においてノザンプロットを行った。AtPSK2における結果を図16に、AtPSKLにおける結果を図17に、それぞれ示す。図16と図17において、レーン1は茎における結果を、レーン2は葉における結果を、レーン3は根における結果を、それぞれ示す。尚、図16と図17のAはAtPSK2又はAtPSKLのmRNAをプロッティングにより検出した結果を、BはAを定量化した結果を、Cは構成的に発現しているアクチンを検出した結果を、それぞれ示す。AtPSK2転写産物は、シロイヌナズナ芽生え中に蓄積しており、mRNAは根に最も多く発現し、盛んに成長している組織において発現していた（図16A）。AtPSKLもまた、芽生えにおいて発現し、根に最も多く発現していた。しかし、茎頂を含む茎の転写産物はAtPSK2の場合より多かった（図17A）。これらの知見は、PSK- α 分子もまた産生され、無傷植物において生理的な作用を有していることを示している。

【0056】

（参考文献）

1. Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R. (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 289, 617-619.
2. Chomczynski P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-536.
3. Clark, S.E., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M. (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89, 575-585.
4. Dorner, A.J. and Kaufman, R.J. (1990) Analysis of synthesis, processing, and secretion of proteins expressed in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185, 577-598.
5. Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E

.M. (1999) Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283, 1911-1914.

6. Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.

7. Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., Kamada, H., and Sakagami, Y. (2000a) A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol.* 41, 27-32.

8. Hanai, H., Nakayama, D., Yang, H., Matsubayashi, Y., Hirota, Y., and Sakagami, Y. (2000b) Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine O-sulfation of preprophytosulfokine variants in vitro. *FEBS Lett.* 470, 97-101.

9. Harris, R.B. (1989) Processing of pro-hormone precursor proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 315-333.

10. Huttner, W.B. (1984) Determination and occurrence of tyrosine O-Sulfate in protein. *Methods Enzymol.* 107, 200-223.

11. Kobayashi, T., Eun, C.-H., Hanai, H., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. and Kamada, H. (1999) Phytosulfokine-a, a peptidyl plant growth factor, stimulates cell division that leads to somatic embryogenesis in carrot. *J. Exp. Bot.* 50, 1123-1128.

12. Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Lister, N., Dean, C., and Whittier, R.F. (1996) Isolation and mapping of a new set of 129 RFLP markers in *Arabidopsis thaliana* using recombinant inbred lines. *Plant J.* 10, 733-736.

13. Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induced the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7623-7627.

14. Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O. and Sakagami, Y. (1996) Active fragments and analogs of the plant growth factor, Phytosulfokine: struc

ture-activity relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 209-214

15. Matsubayashi, Y., Takagi, L., and Sakagami, Y. (1997). Phytosulfokin e-a, a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13357-13362.
16. Matsubayashi, Y., Takagi, L., Omura, N., Morita, A., and Sakagami, Y. (1999) The endogenous sulfated pentapeptide, phytosulfokine-a, stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 120, 1043-1048.
17. Matsuoka, K. and Nakamura, K. (1991) Prepeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 88, 834-838.
18. McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M. & Ryan, C. A. (1992) Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255, 1570-1573.
19. Meyerowitz, E.M., Running, M.P., Sakai, H., and Williams, R.W. (1998) Multiple modes of cell division control in *Arabidopsis* flower development. *Symp Soc Exp Biol* 51, 19-26.
20. Murashige, T. and Skoog, F. (1960) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.
21. Murry, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.
22. Niehrs, C. and Huttner, W.B. (1990) Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase. *EMBL J.* 9, 35-42.
23. Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. & Ryan, C. A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253, 895-898.
24. Reiter, R.S., Williams, J.G., Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey

, S.V. and Scolnik, P.A. (1992) Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1477-1481.

25. The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.

26. Thompson, J.P., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

27. Trottochaud, A.E., Jeong, S., and Clark, S.E. (2000) CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* 289, 613-617.

28. Valvekens, D., Van Montagu, M., and Van Lijsebettens, M. (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5536-5540.

29. Van Haute, E., Joos, H., Maes, S., Warren, G., Van Montagu, M., and Schell, J. (1983) Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 2, 411-418.

30. Wendel, J.F. (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 42, 225-249.

31. Yamakawa, S., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H., and Satoh, S. (1998a) Promotion by a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-a, of chlorophyll formation in etiolated cotyledons of cucumber. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2441-2443.

32. Yamakawa, S., Sakurai, C., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H., and Satoh, S. (1998b) The promotive effects of a peptidyl plant growth

h factor, phytosulfokine, on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. J. Plant Res. 111, 453-458.

33. Yamakawa, S., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H., and Satoh, S. (1999) Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-a, on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 2240-2243.

34. Yang, G., Shen, S., Kobayashi, T., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., and Kamada, H. (1999a) Stimulatory effects of a novel peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-a, on adventitious bud formation in *Antirrhinum majus*. Plant Biotechnol. 16, 231-234.

35. Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. (1999b) *Oryza sativa* PSK encodes a precursor of phytosulfokine-a, a sulfated peptide growth factor found in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13560-13565.

36. Yang, H., Matsubayashi, Y., Hanai, H., and Sakagami, Y. (2000a) Phytosulfokine-a, a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. Plant Cell Physiol. 41, 825-830.

37. Yang, H., Matsubayashi, Y., Hanai, H., Nakamura, K. and Sakagami, Y. (2000b) Molecular cloning and characterization of OsPSK, a gene encoding a precursor for phytosulfokine-a, required for rice cell proliferation. Plant Mol. Biol. 44, 635-647.

【0057】

【発明の効果】

本発明により、植物細胞の増殖を促進する作用を有するペプチドの前駆体であり、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドである、AtPSK2ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードするAtPSK2遺伝

子が与えられた。また、やはりシロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドであり、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドである、AtPSKLポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードするAtPSKL遺伝子が与えられた。これらの遺伝子を導入する事により、植物細胞の増殖を促進することができる。

【0058】

【配列表】

<110>出願人氏名：名古屋大学長

<120>発明の名称：シロイヌナズナのファイトスルフォカイン前駆体ポリペ
プチド、当該タンパク質をコードする遺伝子

<160>配列の数：4

<210>配列番号：1

<211>配列の長さ：87

<212>配列の型：アミノ酸

<213>起源：シロイヌナズナ種子

<400>配列

MANVSALLTI ALLLCSTLMC TARPEPAISI SITTAADPCN MEKKIEGKLD DMHMVEENCG	60
ADDEDCLMRR TLVAHTDYIY TQKKKHP	87

<210>配列番号：2

<211>配列の長さ：545

<212>配列の型：核酸

<213>起源：シロイヌナズナ種子

<400>配列

TTTAAGCATC	TCTCTCCCTT	CAAAGAAAAT	ATCACAAAAA	TGGCAAACGT	CTCCGCTTTG	60
CTCACCATAG	CTCTTCTCCT	TTGCTCCACG	CTAATGTGCA	CTGCCCGCCC	CGAACCGGCC	120
ATCTCCATCT	CTATCACGAC	TGCTGCCGAT	CCATGTAACA	TGGAGAAGAA	GATAGAAGGA	180
AAATTAGATG	ACATGCATAT	GGTAGACGAA	AACTGTGGTG	CAGACGACGA	AGATTGCTTA	240
ATGAGGAGGA	CTTGGTCGC	TCATACTGAT	TACATCTATA	CCCAGAAGAA	GAAGCATCCT	300
TGATTTCAC	TTACTCATTT	CTAACAAACT	TTTGCTCAAG	ATTATGTAAT	TTATGTCATC	360
CTTAATTAGT	ATTTGTCACA	TACAAGATCA	AGATAGTTAT	GATTGTGATT	ATTTATATGT	420
ATTTTGGATG	ATATATTGTA	GAACTAGAAG	TTTGACAATA	AAAAGTTAT	AGTGTGTTG	480
TATGTTAAG	AAGTTGACA	ATAAAAACCTT	TATAGTGTG	TTGCAAAAAA	AAAAAAAAAA	540
AAAAAA						545

<210>配列番号：3

<211>配列の長さ：79

<212>配列の型：アミノ酸

<213>起源：シロイヌナズナ種子

<400>配列

MGKFTTIFIM ALLLCSTLTY AARLTPTTTT ALSRENSVKE IEGDKVEEES CNGIGEEECL 60

IRRSLLLHTD YIYTQNHKP 79

<210>配列番号：4

<211>配列の長さ：149

<212>配列の型：核酸

<213>起源：シロイヌナズナ種子

<400>配列

CTTCTCAGGC TCCCATTATC TTTCTCTATT TTGCAAATCA GTATGGGTAA GTTCACAAACC	60
ATTTTCATCA TGGCTCTCCT TCTTGCTCT ACGCTAACCT ACGCAGCAAG GCTGACTCCG	120
ACGACAACCA CCGCTTGTC CAGAGAAAAC TCCGTCAAGG AAATTGAAGG AGACAAGGTT	180
GAAGAAGAAA GCTGCAACGG AATTGGAGAA GAAGAATGTT TGATAAGACG AAGCCTTCTT	240
CTTCACACCG ATTACATTTA TACTCAGAAT CACAAGCCCT AAGTTCTGT ATTAGAGCAA	300
TTAATTAAC TAAATTACATTA TCAAACCTAT CACTGTAGTA CTTTCTGTT TCTGTTCGTC	360
TTTTTTGTTT TGTTTTGTTT ATGTTATCGC TATTTAAAG TTTCATTGTT ATTTTGAAAG	420
TTCTTACACC ATCATTATTG ATAGTCTCTT AAAACAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA	479

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、AtPSK2遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列を示す図である。

【図2】 図2は、AtPSKL遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列を示す図である。

【図3】 図3は、AtPSK2遺伝子のコピー数を示す、DNAプロット解析の写真である。

【図4】 図4は、AtPSKL遺伝子のコピー数を示す、DNAプロット解析の写真である。

【図5】 図5は、AtPSK2とイネファイトスルフォカイン前駆体(OsPSK)とのアミノ酸配列の相同性を示す図である。

【図6】 図6は、AtPSKLとイネファイトスルフォカイン前駆体(OsPSK)とのアミノ酸配列の相同性を示す図である。

【図7】 図7は、AtPSK2とAtPSKLとのアミノ酸配列の相同性を示す図である。

【図8】 図8は、AtPSK2遺伝子を導入した形質転換細胞において、導入したAtPSK2遺伝子を検出した、DNAプロット解析の写真である。

【図9】 図9は、AtPSL遺伝子を導入した形質転換細胞において、導入したAtPSKL遺伝子を検出した、DNAプロット解析の写真である。

【図10】 図10は、AtPSK2のセンス形質転換細胞、アンチセンス形質転換細胞においてAtPSK2転写産物量を検出した、プロッティング解析の写真である。

【図11】 図11は、AtPSKLのセンス形質転換細胞、アンチセンス形質転換細胞においてAtPSKL転写産物量を検出した、プロッティング解析の写真である。

【図12】 図12は、AtPSK2のセンス形質転換細胞、アンチセンス形質転換細胞において細胞の成長を比較した写真である。

【図13】 図13は、AtPSKLのセンス形質転換細胞、アンチセンス形質転換細胞において細胞の成長を比較した写真である。

【図14】 図14は、AtPSK2遺伝子の発現の経時変化を示す、プロッティング解析の写真である。

【図15】 図15は、AtPSKL遺伝子の発現の経時変化を示す、プロッティング解析の写真である。

【図16】 図16は、AtPSK2遺伝子の発現の組織特異性を示す、プロッティング解析の写真である。

【図17】 図17は、AtPSKL遺伝子の発現の組織特異性を示す、プロッティング解析の写真である。

【書類名】

図面

【図1】

1 TTTAAGCCATCTCTTCAAGGAAATAATCACAAAAATTGGCAAACGTCTCCGCRTTG 60
 M A N V S A L

61 CTCACCATAGCTCTTCTCCTTGTCCACGCTTAATGTGCACTGCCGCCGAACCGCC 120
 L T A L L C S T L M C T A R P E P A

121 ATCTCCATCTCATACCGACTGCTGCCATCCATGTAAACATGGAGAAGATAGAACGA 180
 I S I T A A D P C N M E K K I E G

181 AAATTAGATGACATGCATATGGCTAGAACAA^DA^CA^GA^TC^GG^CA^GC^A 240
 X L D D M H M V E E N C G A D D E D C L

241 ATGAGGAGGACTTGGTCATACTGATTACATCTATACCCAGAAGGAAGCATCCT 300
 M (R) T L V A H T D Y I Y T Q K (K) H P

301 TGATTTCACTTACTCATTTCTAACAAACTTTGCTCAAGATTATGTAATTGTCATC 360
 *

361 CTTAAATTACTATTGTCACTACAAAGATCAAGATAGTTATGATTGTGATTATTATATGT 420

421 ATTTGGATGATATATTGTGAACTAGAAAGTTGACHTATAAGTTATAGTGTGCTTG 480


481 TATGTTTAAGAACTTTGACAATAAAACCTTATACTGTTGTTGCAAAAAAAA 540


541 AAAAA 545

〔図2〕

1 CTTCTCAGGCTCCATTATCTTCTTGTAACTTCAAGTATGGCTAAGTCACACC 60
M G K F T T

61 ATTTTCACTCATGGCTCTTCTTGTCTACGCTAACCTACGCCAGGCTGACTCCG 120
I F I M A L L C S T L T Y A A R L T P

121 ACGACRACCCACCGCTTCTCAGAGAAACTCCGTCAAGGAATTGAAGGAGACAAGTT 180
T T T A L S R E N S V X E I E G D K V

181 GAAGAAGAAAGCTGAAACGGAATTGGAGAAGAAAGATGTTGATAAGCGAGGCTTCTT 240
E E S C N G I G E E C L I R (R) S L L

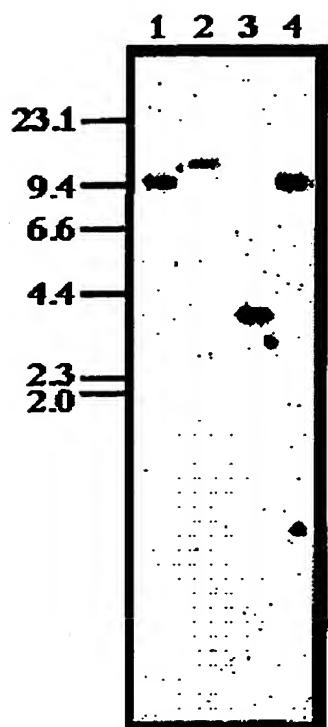
241 CTTCACACCGATTACATTAACTCAGAAATCACAGGCCCTAACGTTCTGATTAGACCAA 300
L H T D Y I Y T Q N H K P *

301 TAAATTAACTTAACATTAAACCTTCACTTGACTTTCGTTTCTGTCGTC 360

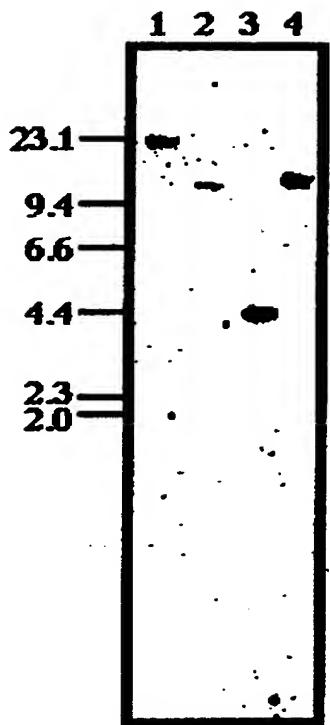
361 TTTTTGTTTGTATGTTATGCTATTAAAGTTCAATTGTATTGTTQAG 420

421 TTCTACACCATCATTATTGATAAGTCTCTTAAACAAAAAAA 479

【図3】



【図4】



【図5】

OsPSK	1:	MVN-PGRTARALCLLCLALLLGQDTHSRK	29
AtPSK2	1:	MANYSALLTIAL-LLCSTLMCTARPEPAIS	29
	**	*** *** *	
OsPSK	30:	L-LLOEKHSHGVGNGTITIQEPSRENGGST	58
AtPSK2	30:	ISITTAADPCNMEKKIEGKLDDHHVVEENC	59
OsPSK	59:	GSNNNGQLQFDSAKWEEFHTDYIYTQDVKN	88
AtPSK2	60:	GADDEDCL-MRRT-LVA-HTDYIYTQKKKH	86
	*	*	***** * *
OsPSK	89:P		89
AtPSK2	87:P		87
	*		

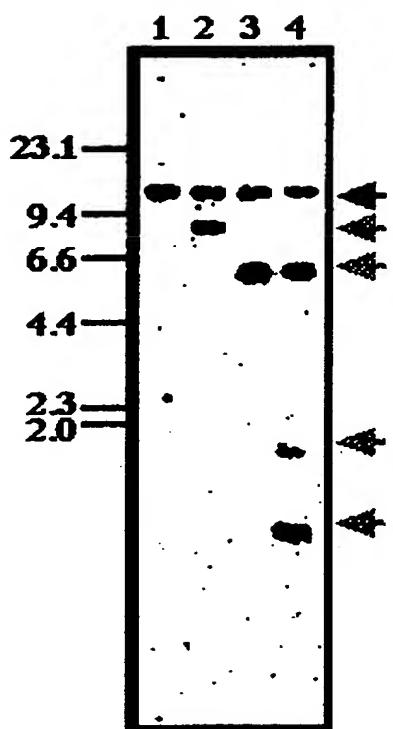
【図6】

OsPSK	1: M V N P G R T A R A L C L L C L A L L L L G Q D T H S R K L	30
AtPSKL	1: — M G K F T - T I - F I - M A L L C S T L T Y A A R L	24
	* ★★★★★ ★★ ★	
OsPSK	31: L L Q E K H S H G V G N G T T T Q E P S R E N G G S T G S	60
AtPSKL	25: T P T T T A L S R E N S V K E I E G D K V E E E S C N G I	54
	* * ★	
OsPSK	61: N N N G Q L Q F D S A K V E E F H T D Y I Y T Q D V K N P	89
AtPSKL	55: G E E E C L - I - R - R S L L L H T D Y I Y T Q N H K - P	79
	* ***** ** *	

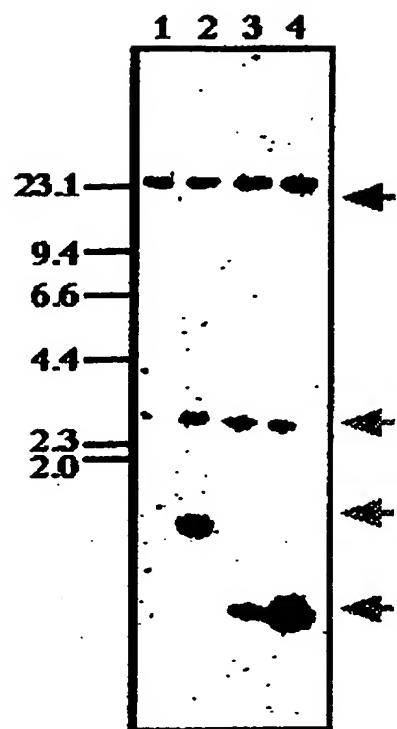
【図7】

AtPSK2	1: M A N V S A L L T I A L L C S T L M C T A R P E P A I S I	30
AtPSKL	1: M G K F T I F I M A L L C S T L T Y A A R L T P T T T	30
	* ★★★★★★★★ ★★ ★	
AtPSK2	31: S I T T A A D P C N M E K K I E G K L D D M M V E E N C -	59
AtPSKL	31: A L S R - E N - S V - K E I E G - D K V E - E E S C N	52
	* ★★★ ★ * ★★ ★	
AtPSK2	60: G A D D E D C L M R R T L V A H T D Y I Y T Q K K K H P	87
AtPSKL	53: G I G E E E C L I R R S L L L H T D Y I Y T Q N H K - P	79
	* * ★★ ★ ★★★★★★★★ * *	

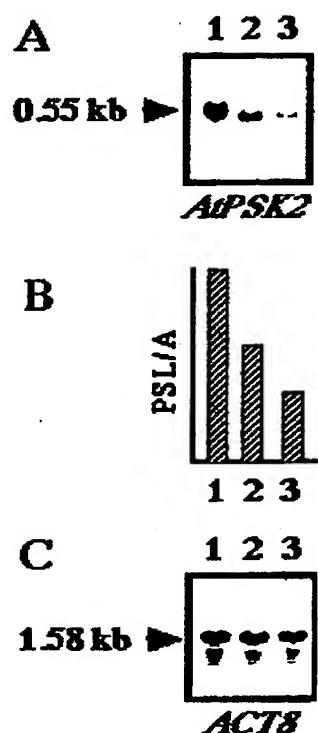
【図8】



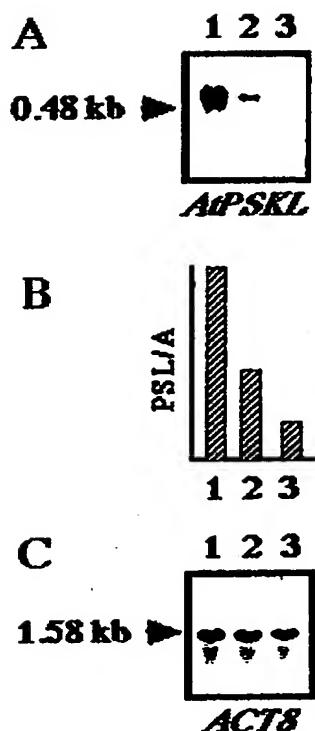
【図9】



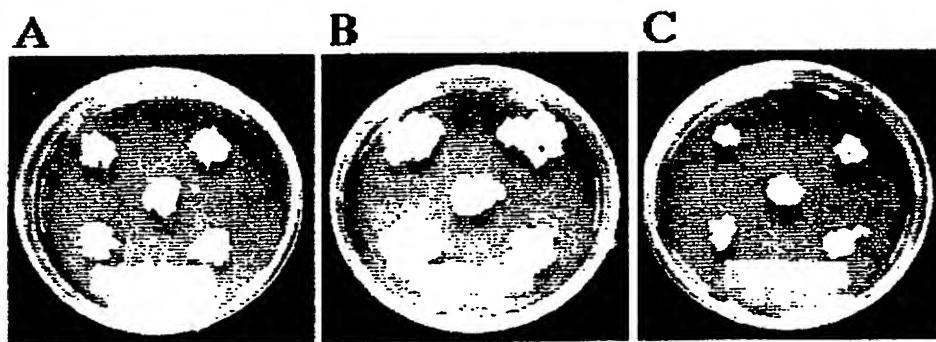
【図10】



【図11】



【図12】

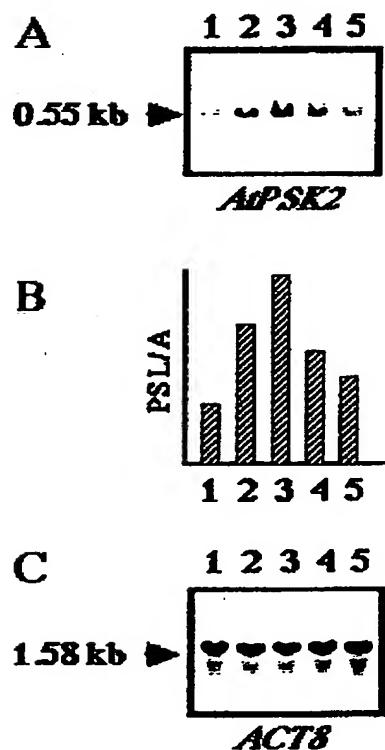


NOT AVAILABLE COPY

【図13】

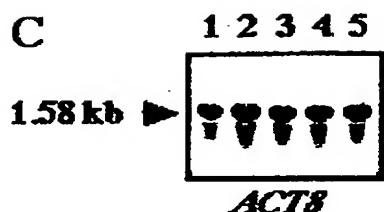
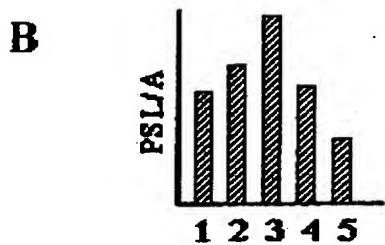
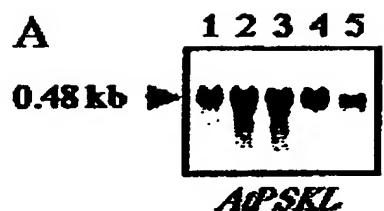


【図14】

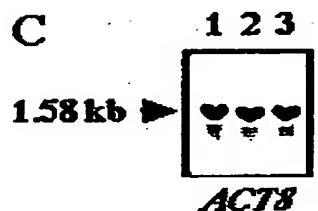
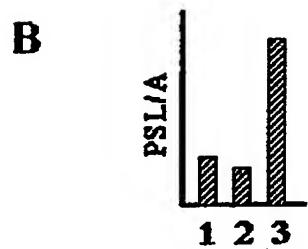
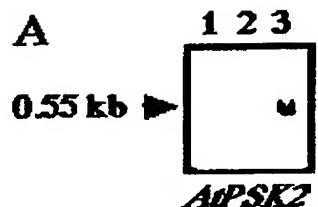


BEST AVAILABLE COPY

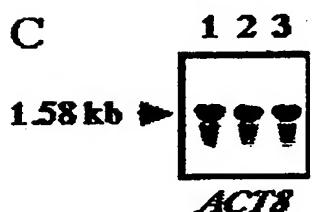
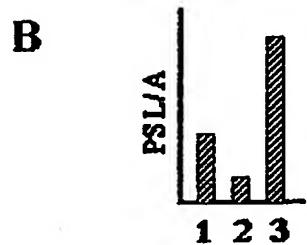
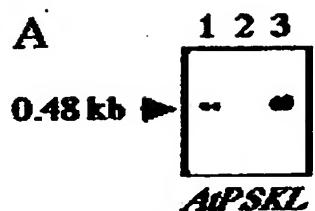
【図15】



【図16】



【図17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物細胞の増殖を促進するために有用な、新規の遺伝子を採取することが本発明の課題である。

【解決手段】 本発明により、植物細胞の増殖を促進する作用を有するペプチドの前駆体であり、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドである、AtPSK2ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードするAtPSK2遺伝子が与えられた。また、やはりシロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドであり、シロイヌナズナ由来のファイトスルフォカイン前駆体ポリペプチドである、AtPSKLポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードするAtPSKL遺伝子が与えられた。これらの遺伝子を導入することにより、植物細胞の増殖を促進することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-052946
受付番号	50100277415
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成13年 2月28日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 391012224
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町（番地なし）
 【氏名又は名称】 名古屋大学長

【代理人】

【識別番号】 100072051
 【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
 【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100059258
 【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
 【氏名又は名称】 杉村 曜秀

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [391012224]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市千種区不老町（番地なし）
氏 名 名古屋大学長